

HYBRIDIZATION APPARATUS AND METHOD FOR DETECTING NUCLEIC ACID IN SAMPLE BY USING THE SAME

Patent number: JP2003093038

Publication date: 2003-04-02

Inventor: MATSUNAGA TADASHI; YODA SEI; UDAGAWA YUJI; NEMOTO ETSUO; MARUYAMA KOHEI

Applicant: JUKI KK; MATSUNAGA TADASHI

Classification:

- International: C12M1/00; C12M1/38; C12M1/42; C12N15/09; C12Q1/68; G01N33/53; G01N33/553; G01N33/566; G01N35/02; C12M1/00; C12M1/36; C12M1/42; C12N15/09; C12Q1/68; G01N33/53; G01N33/551; G01N33/566; G01N35/02; (IPC1-7): G01N33/553; G01N33/566; C12M1/00; C12M1/38; C12M1/42; C12N15/09; C12Q1/68; G01N33/53; G01N35/02

- european:

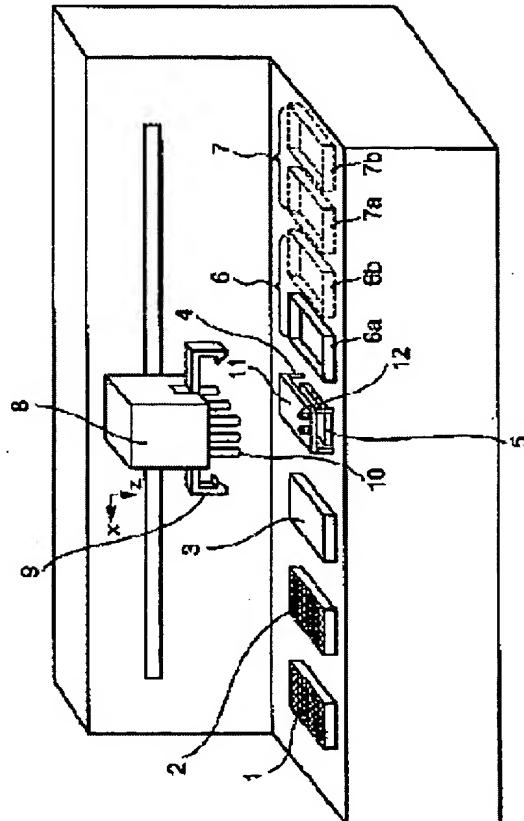
Application number: JP20010289938 20010921

Priority number(s): JP20010289938 20010921

[Report a data error here](#)

Abstract of JP2003093038

PROBLEM TO BE SOLVED: To automate a hybridization process, which usually spends the longest time in the detection process of a nucleic acid, and needs a wide experimental space, by extremely simple operations, and at the same time to downsize the whole equipment. **SOLUTION:** The hybridization apparatus is composed of the following parts: a denature part 1 comprising a reaction vessel holder, and a warming and cooling device; an annealing part 2 comprising a reaction vessel holder, and a warming and cooling device; a magnetic separation part 3 comprising a reaction vessel holder and a magnetic force-controlling apparatus; a chip rack storing part 4 comprising a chip rack 11; a washing liquid part 6 comprising a washing liquid container; a waste liquid part 5 comprising a waste liquid container; and a head part 8. The head part 8 comprises a plurality of chip nozzles, a mechanism for attaching and detaching the chips on the chip nozzles, a mechanism with which a mounted chip absorbs and pours a treating liquid, a robot hand mechanism which can freely grasp and release a reaction vessel, and an arm unit which can freely move in the X-Z axis direction.



(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-93038

(P2003-93038A)

(43) 公開日 平成15年4月2日 (2003.4.2)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テ-マコ-ト⁸ (参考)

C 12 M 1/00

C 12 M 1/00

A 2 G 0 5 8

1/38

1/38

Z 4 B 0 2 4

1/42

1/42

4 B 0 2 9

C 12 N 15/09

C 12 Q 1/68

A 4 B 0 6 3

C 12 Q 1/68

G 01 N 33/53

M

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願2001-289938 (P2001-289938)

(71) 出願人 000003399

ジューキ株式会社

東京都調布市国領町8丁目2番地の1

(22) 出願日

平成13年9月21日 (2001.9.21)

(71) 出願人 591033744

松永 是

東京都小金井市本町4-20-15

(72) 発明者 松永 是

東京都小金井市本町4-20-15

(74) 代理人 100068700

弁理士 有賀 三幸 (外6名)

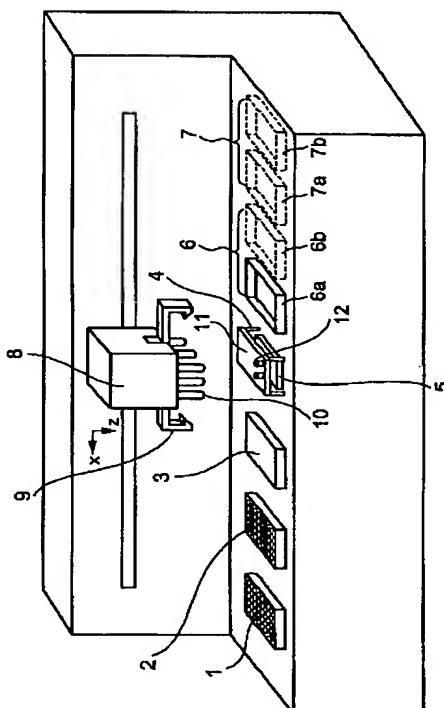
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ハイブリダイゼーション装置及びこれを用いたサンプル中の核酸検出方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 核酸の検出において最も時間がかかり、広い実験スペースを要するハイブリダイゼーション工程を、極めて単純な動作をもって自動化し、同時に装置全体を小型化する。

【解決手段】 反応容器保持具及び加温・冷却装置を備えてなるディネーチャー部1、反応容器保持具及び加温・冷却装置を備えてなるアニーリング部2、反応容器保持具及び磁力制御装置を備えてなる磁気分離部3、チップラック11を備えてなるチップラック収納部4、洗浄液収容容器を備えてなる洗浄液部6、廃液収容容器を備えてなる廃液部5及び複数本のチップノズルを装備し、該チップノズルにチップを装着・脱着させる機構と、装着されたチップが処理液を吸引・注入する機構と、反応容器の把持及び離脱を自由に行わせることが可能なロボットハンド機構とを有し、X-Z軸方向へ自在に移動可能なアームユニットを備えてなるヘッド部8より構成される。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくとも(A)反応容器保持具及び加温・冷却装置を備えてなるディネーチャー部、(B)反応容器保持具及び加温・冷却装置を備えてなるアニーリング部、(C)反応容器保持具及び磁力制御装置を備えてなる磁気分離部、(D)チップラックを備えてなるチップラック収納部、(E)洗浄液収容容器を備えてなる洗浄液部、(F)廃液収容容器を備えてなる廃液部及び(G)複数本のチップノズルを装備し、該チップノズルにチップを装着・脱着させる機構と、装着されたチップが処理液を吸引・注入する機構と、反応容器の把持及び離脱を自由に行わせることが可能なロボットハンド機構とを有し、X-Z軸方向へ自在に移動可能なアームユニットを備えてなるヘッド部、より構成される自動核酸ハイブリダイゼーション装置。

【請求項2】 (F)廃液部を(D)チップラック収納部の下部に配置する請求項1記載の自動核酸ハイブリダイゼーション装置。

【請求項3】 更に、(H)試薬収容容器を備えてなる試薬部をもつ請求項1又は2記載の自動核酸ハイブリダイゼーション装置。

【請求項4】 請求項1～3のいずれか1項記載のハイブリダイゼーション装置を用いて、下記工程(1)～(10)、所望により更に工程(11)～(15)を自動で行い、次いで反応容器中の標識核酸量を測定することを特徴とするサンプル中の核酸検出方法。

(1) 核酸プローブ固定化磁性粒子、標識プローブ及びサンプル核酸、又は核酸プローブ固定化磁性粒子及び標識されたサンプル核酸が注入・混合された反応容器をディネーチャー部に設置し、加温・冷却装置により反応容器中の温度を核酸のディネーチャー温度に設定し、当該温度を所定時間保持してサンプル核酸を一本鎖化する。

(2) アームユニットを稼働してディネーチャー部の反応容器をアニーリング部に移送する。

(3) アニーリング部の加温・冷却装置により反応容器中の温度を核酸のアニーリング温度に設定し、当該温度を所定時間保持してアニーリングを行なう。

(4) アームユニットをアニーリング部に移動し、反応容器を磁気分離部に移送する。

(5) 磁力制御装置を稼働して磁性粒子に結合したサンプル核酸を容器中に偏在させる。

(6) アームユニットをチップラック収納部に移動し、チップノズルにチップを装着する。

(7) アームユニットを磁気分離部に移動し、反応容器中の上清をチップノズルにて吸引する。

(8) アームユニットを廃液部に移動し、チップノズル内の吸引上清を廃液部の廃棄収容容器に排出する。

(9) アームユニットを洗浄液部に移動し、洗浄液収容容器から洗浄液を吸引し、磁気分離部の反応容器中に洗浄液を注入する。

(10) (7)～(9)の洗浄動作を所定回数繰り返す。

(11) (7)～(8)を行った後、アームユニットを第一試薬部へ移動させ、試薬収容容器から標識試薬を吸引し、磁気分離部の反応容器中にこれを注入し、所定時間保持する。

(12) 反応容器中の上清をチップノズルにて吸引し、アームユニットを廃液部に移動し、チップノズル内の吸引上清を廃液部の廃棄収容容器に排出する。

(13) アームユニットを第二洗浄液部へ移動し、第二洗浄液収容容器より洗浄液を吸引し、磁気分離部の反応容器中にこれを注入し、所定時間保持する。

(14) (12)～(13)の洗浄動作を所定回数繰り返した後(12)の動作を行う。

(15) アームユニットを第二試薬部へ移動し、試薬収容容器から発色試薬を吸引し、磁気分離部の反応容器中にこれを注入する。

【請求項5】 反応容器として、核酸プローブ固定化磁性粒子を予め備えた試薬ユニットを使用する請求項4記載の核酸検出方法。

【請求項6】 反応容器として、核酸プローブ固定化磁性粒子と発光標識用プローブとを予め備えた試薬ユニットを使用する請求項4記載の核酸検出方法。

【請求項7】 磁性粒子が、磁性細菌粒子である請求項4～6記載の核酸検出方法。

【請求項8】 磁性粒子に固定化された核酸が、一本鎖DNA、RNA又はPNAである請求項4～7のいずれか1項記載の核酸検出方法。

【請求項9】 サンプル核酸が、蛍光色素、アルカリファスファターゼ又はフェロセンによりマーカー標識されたものである請求項4～8のいずれか1項記載の核酸検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、核酸プローブによるハイブリダイゼーションを自動で行うハイブリダイゼーション装置及びこれを用いたサンプル中の核酸検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、DNAプローブを用いた核酸ハイブリダイゼーションの技術を使用して、試料中の特定塩基配列の有無を調べることにより、感染症の病原菌の特定や感染症の発症前の診断、更には遺伝子疾患の診断が可能になってきた。核酸ハイブリダイゼーション法には、試料を変性処理して得た一本鎖核酸を固相に結合させ、この固相にラジオアイソトープや蛍光色素等で標識した核酸を作用させて固相の核酸とハイブリッドを形成させてから未反応の標識核酸を除去し、固相の放射線量や蛍光等を測定するドットハイブリダイゼーション法を始めとし、識別しようとする標的核酸に関係する核酸

ラグメントを少なくとも2つ使用するサンドイッチハイブリダイゼーション法がよく知られている。

【0003】斯かるハイブリダイゼーション用いたサンプル核酸の測定作業は、サンプル数が多いため単純な作業の繰り返しが発生すること、各工程で用いる装置が独立しているため広い設置面積が必要であること、反応温度の管理を行う必要があり反応の進行に長時間を要すること、更に微量な試料を精度高く取り扱うことが必要であること等の理由から、ハイブリダイゼーション工程を機械化して自動的に行なうことが従来から切望されていた。

【0004】これまでに、ハイブリダイゼーション工程を含む核酸の自動検出装置としては、例えばDNAサンプル・試薬ユニット、サンプル・試薬分注ユニット、反応容器搬送ユニット、ハイブリダイゼーションユニット、B/F分離ユニット及び測光ユニットを備えてなるDNAプローブ自動測定装置（特許第3055342号公報）が報告されているが、この装置については、サンプル・試薬ともに複数の容器を備えたものであり、また複数のサンプルを同時処理するものではなく、装置の縮小化やハイブリダイゼーション工程の効率化の点で、必ずしも充分ではなかった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、短時間で効率よくハイブリダイゼーションを行うことができ、しかも広い実験スペースを要しないハイブリダイゼーション装置を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、斯かる実情に鑑み、核酸ハイブリダイゼーションの自動化について鋭意検討したところ、加温・冷却装置と磁力制御装置と共に装備することにより、極めて単純な動作をもってハイブリダイゼーション工程を自動化でき、同時に装置全体の小型化が図れることを見出し、本発明を完成した。

【0007】すなわち本発明は、少なくとも（A）反応容器保持具及び加温・冷却装置を備えてなるディネーチャー部、（B）反応容器保持具及び加温・冷却装置を備えてなるアーニーリング部、（C）反応容器保持具及び磁力制御装置を備えてなる磁気分離部、（D）チップラックを備えてなるチップラック収納部、（E）洗浄液収容容器を備えてなる洗浄液部、（F）廃液収容容器を備えてなる廃液部及び（G）複数本のチップノズルを装備し、該チップノズルにチップを装着・脱着させる機構と、装着されたチップが処理液を吸引・注入する機構と、反応容器の把持及び離脱を自由に行なわせることが可能なロボットハンド機構とを有し、X-Z軸方向へ自在に移動可能なアームユニットを備えてなるヘッド部、より構成される自動核酸ハイブリダイゼーション装置を提供するものである。

【0008】また本発明は、当該ハイブリダイゼーション装置を用いて、下記工程（1）～（10）、所望により更に工程（11）～（15）を自動で行い、次いで反応容器中の標識核酸量を測定することを特徴とするサンプル中の核酸検出方法を提供するものである。

（1）核酸プローブ固定化磁性粒子、標識プローブ及びサンプル核酸、又は核酸プローブ固定化磁性粒子及び標識されたサンプル核酸が注入・混合された反応容器をディネーチャー部に設置し、加温・冷却装置により反応容器中の温度を核酸のディネーチャー温度に設定し、当該温度を所定時間保持してサンプル核酸を一本鎖化する。

（2）アームユニットを稼働してディネーチャー部の反応容器をアーニーリング部に移送する。

（3）アーニーリング部の加温・冷却装置により反応容器中の温度を核酸のアーニーリング温度に設定し、当該温度を所定時間保持してアーニーリングを行なう。

（4）アームユニットをアーニーリング部に移動し、反応容器を磁気分離部に移送する。

（5）磁力制御装置を稼働して磁性粒子に結合したサンプル核酸を容器中に偏在させる。

（6）アームユニットをチップラック収納部に移動し、チップノズルにチップを装着する。

（7）アームユニットを磁気分離部に移動し、反応容器中の上清をチップノズルにて吸引する。

（8）アームユニットを廃液部に移動し、チップノズル内の吸引上清を廃液部の廃棄収容容器に排出する。

（9）アームユニットを洗浄液部に移動し、洗浄液収容容器から洗浄液を吸引し、磁気分離部の反応容器中に洗浄液を注入する。

（10）（7）～（9）の洗浄動作を所定回数繰り返す。

（11）（7）～（8）を行った後、アームユニットを第一試薬部へ移動させ、試薬収容容器から標識試薬を吸引し、磁気分離部の反応容器中にこれを注入し、所定時間保持する。

（12）反応容器中の上清をチップノズルにて吸引し、アームユニットを廃液部に移動し、チップノズル内の吸引上清を廃液部の廃棄収容容器に排出する。

（13）アームユニットを第二洗浄液部へ移動し、第二洗浄液収容容器より洗浄液を吸引し、磁気分離部の反応容器中にこれを注入し、所定時間保持する。

（14）（12）～（13）の洗浄動作を所定回数繰り返した後（12）の動作を行う。

（15）アームユニットを第二試薬部へ移動し、試薬収容容器から発色試薬を吸引し、磁気分離部の反応容器中にこれを注入する。

【0009】

【発明の実施の形態】以下、図面に基づいて、本発明装置の具体例を説明する。図1は、本発明ハイブリダイゼーション装置の内部構成を示す概念図である。1はサン

フル核酸を一本鎖（ディナーチャー）化するためのディナーチャー部であり、2は一本鎖化されたサンプル核酸と特定の核酸プローブとのハイブリダイゼーション（アニーニング）を行うアニーリング部である。ディナーチャー部1及びアニーリング部2は、共に反応容器を収納保持するための保持具と、ディナーチャー及びアニーリングの各温度を調節する加温・冷却装置とから構成される。

【0010】図2にディナーチャー部1及びアニーリング部2の側面図を示す。同図において、13はディナーチャー及びアニーリングを行うための反応容器である。斯かる反応容器としては、核酸ハイブリダイゼーションに適するものであれば、その形状及び材質には特に制限されるものではないが、複数のサンプルを同時に試験でき、且つ汎用性の高い樹脂製の24～96ウェルマイクロプレートを使用するのが好ましい。

【0011】加温・冷却装置は、反応容器保持具a14を加温するヒーター15と、これを冷却するチラー16と、温度を制御するセンサー17と、温度を制御する温度制御装置18とを備えるものである。尚、ここで用いられる反応容器保持具a14は、使用する反応容器表面と密着する形状を有する金属製プレートが使用される。ディナーチャー部1における温度制御装置は、収容容器内部でディナーチャー反応を進行させる温度である95℃（一般的には95℃前後であるが、サンプル核酸の長さが短い場合はこれより低くてもよい）にコントロールされるように固定され、アニーリング部2における温度制御装置は、容器内部でハイブリダイゼーション（アニーリング）させる温度である40～70℃に固定される。また、温度制御装置のタイマー機能により反応時間もコントロールされる。

【0012】ディナーチャー部1におけるディナーチャー反応終了後、ヘッド部8のアームユニットにより、ディナーチャー部1に保持されていた反応容器はアニーリング部2の反応容器保持具上へ移送される。

【0013】3は磁気分離部であって、反応容器を固定するための反応容器保持具b19と磁力制御装置20を備える。図3に磁気分離部の側面図を示す。

【0014】磁気分離部は、本装置におけるB/F分離を行うステージであり、磁力制御装置20が、反応容器それぞれについて対応する磁力を発生し、容器内のB/F分離に使用する磁性粒子に磁力を作用させる。斯かる磁力制御装置は、反応容器の底部のみに磁性粒子が不動化するように磁力制御するように配置される。反応容器の真下に置くことで容器底面の狭い領域に集めることができる。磁力発生源を容器側面から近づけると磁束に沿って上下に長く伸びてしまうため、樹脂の反応容器を使った場合には容器内側の界面に大量の磁性粒子の吸着が起こることがあり、集めることには不適である。具体的には反応容器の下部に配置し、反応容器下部の磁力を○

N、OFFすることにより磁力制御すればよい。例えば、磁力発生源を容器底に接近することで反応容器内の磁性粒子に磁力を作用させ、また容器から下方又は横方向等に隔離することで、磁力を遮断させる。

【0015】ここで、磁気発生源としては、例えば、永久磁石、電磁石等が挙げられるが、このうち多数ウェルのプレートに対応するため、磁石を密に配置するには小型化が容易な永久磁石を用いるのが好ましく、特に永久磁石を、96ウェルマイクロプレートの各ウェルに対応するようにアレイ状に並べ、隣り合う磁石の磁極をN、S極交互に配置することが好ましい。これにより反応容器に作用させる磁束の乱れを防ぐことができ、効率よく磁性粒子を凝集させることができる。

【0016】尚、本発明装置を用いた核酸ハイブリダイゼーションにおいて使用される磁性粒子としては、水溶液中で不溶性であり且つ磁性を示すものであるならば特に限定されるものではない。例えば、 Fe_0 、 $r-Fe_0$ 、 C_0-r-Fe_0 、 $(NiCuZn)_0$ 、 Fe_0 、 $(CuZn)_0$ 、 Fe_0 、 $(MnZn)_0$ 、 Fe_0 、 $(NiZn)_0$ 、 Fe_0 、 Sr_0 、 $6Fe_0$ 、 Ba_0 、 $6Fe_0$ 、 SiO_2 で被覆した Fe_0 （粒径約200 A）〔Enzyme Microb. Technol., vol2, p.2-10(1980) 参照〕、各種の高分子材料（ナイロン、ポリアクリルアミド、ポリスチレン等）とフェライトとの複合微粒子及び磁性細菌が菌体内に合成する磁性細菌粒子等が挙げられる。

【0017】尚、磁性細菌は、1970年代、アメリカで発見され、菌体内に50～100nmの程度の粒径のマグнетাইト（ Fe_3O_4 ）単結晶の微粒子が10～20個ほど連なったマグネットソームと呼ばれるチェイン状の粒子を保持している。磁性細菌はこのマグネットソームを保持することで地磁気を感知し、磁力線の方向を認識することができる。磁性細菌は微好気性の細菌であり、地磁気を感知することで好気的な水面から微好気的な沈殿物表層へ磁力線に沿って泳ぐことができる。斯かる磁性細菌は、ANALYTICAL CHEMISTRY, VOL. 63, No. 3, FEBRUARY 1, 1991 P268-P272に示されるように、単菌分離され、大量培養が可能となっている。この磁性細菌中の磁性粒子は、六角柱で粒径、形状が非常に均一であり、純度も高く、粒子を含む菌体の磁化を微粒子当たりに換算すると約50emu/gである。また、保磁力は230 Oeで、単磁区構造をとっていることが確かめられている。また、この磁性粒子は、粒子表面が有機薄膜で覆われていることから金属の溶出がほとんど起こらず安定に存在し、水溶液中での分散性にも優れているといった特性を有している。従って、本発明において用いられる核酸ハイブリダイゼーションでは磁性細菌粒子を用いるのが好ましい。

【0018】磁性細菌からの磁性細菌粒子の抽出方法には、フレンチプレスを用いた物理的圧力破碎、アルカリ煮沸、酵素処理、超音波破碎処理等が知られており、磁性細菌粒子を大量に得る場合には、超音波による破碎が適している。抽出後、磁石等により磁性細菌粒子を分離

すればよい。

【0019】尚、ディネーチャー部1、アニーリング部2及び磁気分離部3を統合し、一つの反応容器保持具、加温・冷却装置及び磁力発生装置を備える構造としてもよく、当該構造もまた本発明ハイブリダイゼーション装置に包含される。このような構成をとることにより、装置の設置面積がコンパクトになるばかりでなく、工程が変わることにヘッド部によって反応容器を移動させる工程が少なくなり、それによる時間のロスが少なくなるという利点がある。

【0020】4は、チップラック収納部であって、洗浄液や試薬を分注するためのディスポチップを保持するチップラック11が収納されている。該ラックには、チップの保持位置を規定する穴が空けてあり、測定を開始する前はそこにディスポチップ12がささっている。

【0021】5は、廃液部であって、洗浄後の廃液を溜める廃液収容容器を備えるものである。廃液部は、磁気分離／洗浄時に磁気分離部から吸い上げた廃液を排出し、留めておくためのものである。

【0022】6は、洗浄液部であって、洗浄液収容容器を備えるものである。洗浄液部は必要に応じて複数設けることができる。例えばハイブリダイズされた核酸を検出するために免疫反応を行う場合は2つの洗浄液部（第一洗浄部（6a）と第二洗浄部（6b））が必要となる。

【0023】8は、ヘッド部であり、X-Z軸方向へ移動自在のアームユニットを有し、当該アームユニットは、チップノズルと、ヘッド部を移動させる機構と、該ヘッド部を移動させることにより該チップノズルにチップを装着・脱着させる機構と、装着されたチップから処理液（廃液や洗浄液）を吸引・注入する機構と、該ヘッド部に懸架され、反応容器の把持及び離脱を自由に行わせることが可能なロボットハンド機構9、より構成されている。

【0024】本発明のハイブリダイゼーション装置には、必要に応じて更に試薬部（H）を設けることができる。例えば、ハイブリダイズされた核酸を検出するための標識が必要な場合は、当該標識試薬（例えばアルカリフォスファターゼ標識アンチ-DIG-Fab'フラグメント（anti-DIG-AP）等）や酵素発色基質（例えば、アルカリフォスファターゼ発光基質等）を収納するための試薬部7を設ける必要があり、この場合は2つの試薬部（第一試薬部（7a）及び第二試薬部（7b））を設ける必要がある。一方、予めサンプル核酸を蛍光標識する等したものを用いた場合には、本試薬部は設ける必要はない。

【0025】本発明装置において用いられる核酸ハイブリダイゼーション法は、サンプル中の核酸と核酸プローブ固定化磁性粒子のハイブリダイゼーションを利用するものであれば、ハイブリダイゼーション法が1ステップ

法であっても2ステップ法（サンドイッチ法）であってもよい。また、用いる核酸プローブも一本鎖DNA、RNA又はPNAのいずれであってもよい。

【0026】

【実施例】上記本発明のハイブリダイゼーション装置（図1参照）を用いた核酸の検出法の具体例を以下に示す。

1. 準備工程

(1) 磁性細菌粒子の作製

磁性細菌粒子の生産のため、单菌分離された磁性細菌 *Magnetospirillum* sp. AMB-1 (Matsunaga et al. 1991) をMSGM培地 (Blakemore et al. 1979) (100L) を用いて室温で約7日間、嫌気条件下で培養した。培養3日後にキナ酸鉄溶液を培養液1Lに対し4mL添加した。培養した菌体は10000g、4°Cで連続遠心機を用いて回収した。10mMリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4) を用いて懸濁した。この菌体を、150kg/cm²の条件下でフレンチプレス（大岳製作所、5501M）を用いて破碎し、ネオジウムーポロン（Nd-B）磁石を用いて破碎菌体から磁性細菌粒子を磁気回収した。得られた磁性細菌粒子は、超音波洗浄器 (Kaijo Denki Co. Ltd., CA4481) を用いて、PBS中で3回以上洗浄された後、PBSに懸濁され4°Cで保存した。

【0027】(2) 検出用プローブの合成

シアノバクテリアの16S rDNAの領域において属特異的領域を検索し、15～20塩基内において各属間で2～3以上の塩基の差異が見られる領域を見出し、その領域からMicrocystis属特異的検出用プローブDNA1をデザインした。デザインしたプローブDNAについて、5'末端にビオチン標識された合成オリゴDNA及び、5'末端にDIG標識された発光検出用DNAのプローブ2-DIGを作成した。

【0028】(3) DNA固定化磁性細菌粒子の作製

磁性細菌粒子への修飾は、磁性細菌膜上に存在すると考えられるアミノ基を利用した。まず、磁性細菌AMB-1株より抽出・精製された磁性細菌粒子 (BMPs) 1mgを2.5%グルタルアルデヒドを含むPBS 1mL中に懸濁し、室温で30分間反応させることにより、磁性細菌粒子膜上のアミノ基に対してアルデヒド基の導入を行った。反応後、磁気回収し、PBSで3回洗浄した。洗浄後、修飾BMPs 1mgに対して、ストレプトアビシン (New England Bio Labs.) 100μgをPBS 1mL中に懸濁し、室温で2時間反応させることによりBMPsとストレプトアビシンを架橋した。架橋後、PBSで3回磁気回収、及び洗浄を行った後、DNAの非特異吸着を押さえるためにNaBH₄で未反応のアルデヒド基を還元し、ストレプトアビシン固定化BMPs (SA-BMPs)とした。作製したSA-BMPs 300μgに対して5'末端にビオチン標識したオ

リゴDNA 300 pmolをPBS 300 μl中でアビジン・ビオチン反応を行わせ、オリゴDNA固定化磁性細菌粒子（DNA-BMPs）を作製した。ここで、試薬キットとして核酸プローブ固定化磁性細菌粒子又は核酸プローブ固定化磁性細菌粒子と発光標識用プローブとを上記工程で反応容器に予め作成・収納してなるプローブユニットを使用してもよい。そうすることによって、検出するための準備工程を大幅に削減でき、非熟練による能率低下を防止でき、生産性が向上する。

【0029】(4) サンプルDNAの調製

シアノバクテリアからのゲノムDNAの抽出は、MagExtractor-genomeの抽出法を改良した方法により抽出を行った。抽出された全ゲノムDNAに対して、原核微生物を16SrDNA增幅用プライマーRSF-1, RSR-2 (E.coli 1523-1542ntのアンチセンス) (Kawaguchi et al. 1992)を用い、PCRによって遺伝子增幅を行った。尚、標識されたサンプル核酸を用いる場合には、遺伝子增幅の際に、蛍光、発光若しくは電気化学的シグナルによって検出可能な蛍光色素、アルカリフィオスファターゼ、フェロセン等のマーカーで標識したdUTPを用いてPCRを行えばよい。

【0030】(5) 装置への試薬等の設置

- ①チップノズルを保持したチップラックを滅菌後、チップラック収納部に設置する。
- ②洗浄液（リン酸緩衝生理食塩水：PBS）を収容する洗浄液収容容器を、第一洗浄液部に設置する。
- ③検出バッファ（10 mM Tris-HCl（pH 8.3）、1.5 mM MgCl₂、50 mM KCl、0.1% Triton X-100）を収容する洗浄液収容容器を第二洗浄液部に設置する。
- ④廃液収容容器を廃液部に設置する。
- ⑤試薬a（アルカリフィオスファターゼ標識アンチ-DIG Fab'フラグメント（anti-DIG-AP））と0.1% BSAと0.05% Tween 20を含むPBS 200 μlを収容する試薬容器Aを第一試薬部に設置する。
- ⑥試薬b（アルカリフィオスファターゼ発光基質）を収容する試薬容器Bを第二試薬部に設置する。

【0031】2. ディネーチャー工程

100 μlのサンプルDNA（16SrDNAのPCR産物）と100 μgのプローブ1 DNA固定化磁性細菌粒子と、10 pmolプローブ2-DIGを反応容器（マイクロプレート等）で混合し、十分に攪拌した後、ディネーチャー部1の反応容器保持具に設置する。本装置の始動スイッチを投入し、ディネーチャー部1及びアニーリング部2の加温・冷却装置の温度制御機能を稼働させ、それぞれの反応容器をそれぞれ95°C及び60°Cに温める。まずディネーチャー部で5分間保持することにより、反応容器中のサンプル核酸の一本鎖化を行う。

【0032】3. アニーリング工程

ディネーチャー処理終了後、アームユニットを稼働して、反応容器を把持し、アニーリング部の反応容器保持具上で離脱する。ここで10分間保持することにより、容器中の核酸プローブ固定化磁性細菌粒子とサンプル核酸及びプローブ2-DIGのハイブリダイゼーション反応を行う。

【0033】4. B/F分離

アニーリング終了後、アームユニットを稼働し、反応容器を把持し、磁気分離部の反応容器保持具上で離脱する。次いで、容器真下に設置された磁力制御装置により磁気吸引力を発生させ、磁性粒子を容器底面に集める。ユニットを動作させてから約3分間そのまま待機する。

5. 洗浄工程

チップラック上に移動させたアームユニットを下方へ移動させ、チップノズルとディスパチップを嵌合させることで、チップラック収納部に保持されたチップノズルを装着する。アームユニットを磁気分離部へ移動させ、そのまま降下させて、適当な位置で停止後、チップノズルにて磁気分離部の反応容器中の上清を吸引し、廃液部に移動して排出させる。その後アームユニットを洗浄液部へ移動させ、第一洗浄液収容容器より検出バッファを吸引し、アームユニットを磁気分離部へ移動させ、反応容器中にこれを注入する。約3分間の待機後、再びチップノズルで反応容器中の上清を吸引し、廃液部に排出する。この洗浄動作を3回繰り返す。

【0034】6. 免疫反応-洗浄工程

アームユニットを第一試薬部へ移動させ、試薬収容容器から、試薬aアルカリフィオスファターゼ標識アンチ-DIG Fab'フラグメント（anti-DIG-AP）0.1% BSAと0.05% Tween 20を含むPBS 200 μlを吸引し、磁気分離部の反応容器中にこれを注入し、室温で30分間免疫反応を行う。その後、アームユニットを磁気分離部へ移動させ、反応容器中の上清を吸引し廃液部に排出する。次いで、その後アームユニットを洗浄液部へ移動させ、第二洗浄液収容容器より検出バッファを吸引し、アームユニットを磁気分離部へ移動させ、反応容器中にこれを注入する。約3分間の待機後、再びチップノズルで反応容器中の上清を吸引し、廃液部に排出する。この洗浄動作を3回繰り返す。第二試薬部から試薬bアルカリフィオスファターゼ発光基質を100 μl分注し、動作を完了する。

【0035】7. 検出

装置から反応容器を取り出し、発光プレートリーダ（lusa2™）によって反応容器内に生じる光の変化を測定した。

【0036】この結果、*Microcystis aeruginosa* NIES-98のPCR産物試料から最も強い発光が観察された。すなわち、PCRによって増幅された16SrDNAを用いたサンドイッチハイブリダイゼーションにより、シアノバクテリアにおける*Microcystis*属の特異的検出が可能であることが示された。

【0037】

【発明の効果】本発明の自動核酸ハイブリダイゼーション装置によれば、核酸の検出において最も時間がかかる、広い実験スペースを要するハイブリダイゼーション工程を、極めて単純な動作をもって自動化でき、同時に装置全体の小型化が図れる。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明装置の内部構成を示す概念図である。

【図2】図2は、ディネーチャー部1及びアニーリング部2の側面図である。

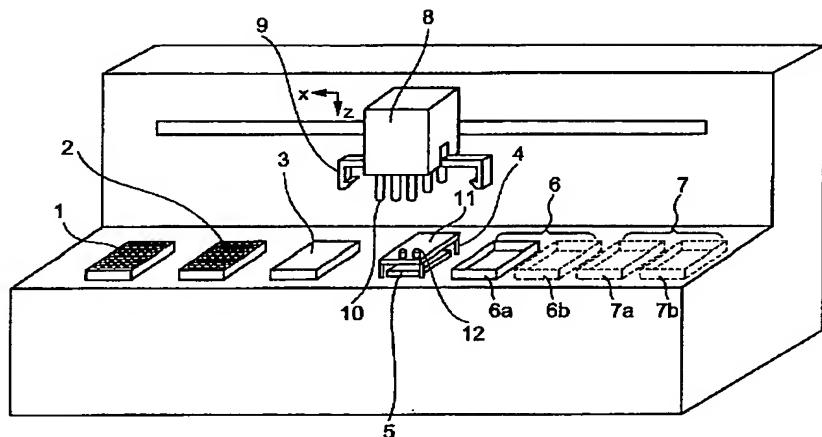
【図3】図3は、磁気分離部の側面図である。

【符号の説明】

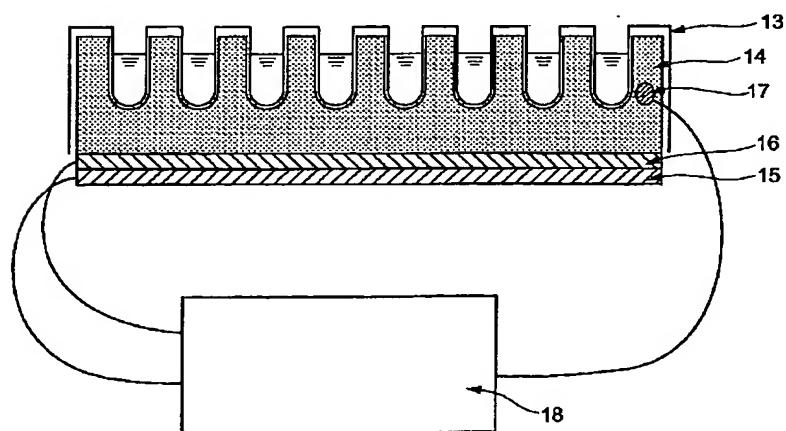
1: ディネーチャー部
2: アニーリング部
3: 磁気分離部
4: チップラック収納部

5: 廃液部
6: 洗浄液部
7: 試薬部
8: ヘッド部
9: ロボットハンド
10: チップノズル
11: チップラック
12: チップ
13: 反応容器
14: 反応容器保持具a
15: ヒータ
16: チラー
17: センサー
18: 温度制御装置
19: 反応容器保持具b
20: 磁力制御装置

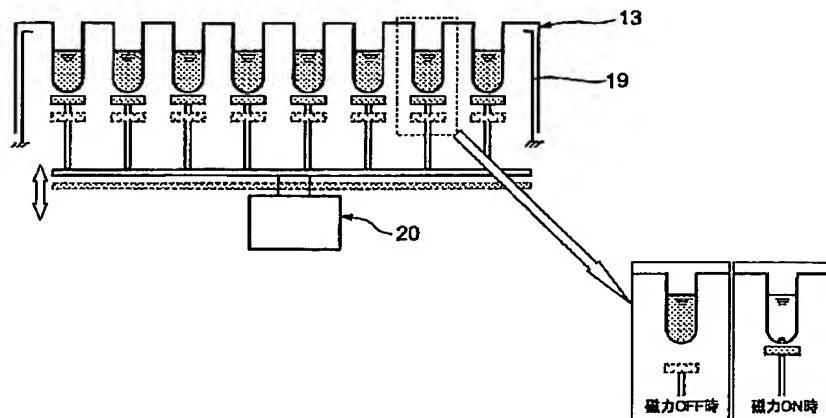
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	マーク(参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 35/02	G
35/02		33/553	
// G 0 1 N 33/553		33/566	
33/566		C 1 2 N 15/00	A
(72)発明者 依田 聖		F ターム(参考) 2G058 AA09 BB02 BB09 BB12 BB15	
東京都調布市国領町8-2-1 ジューキ		CA01 CC01 EA01 EA12 EB01	
株式会社内		ED02 ED08 ED13 ED18 ED35	
(72)発明者 宇田川 雄司		FB01 FB15 FB29 GA01 GB01	
東京都調布市国領町8-2-1 ジューキ		GE02	
株式会社内		4B024 AA11 CA01 CA09 GA19 HA14	
(72)発明者 根本 越男		4B029 AA07 AA12 AA21 AA23 AA27	
東京都調布市国領町8-2-1 ジューキ		BB20 CC03 FA15	
株式会社内		4B063 QA01 QA18 QQ06 QQ42 QR32	
(72)発明者 丸山 浩平		QR35 QR38 QR56 QR75 QR82	
東京都調布市国領町8-2-1 ジューキ		QS25 QS34 QS38 QX02	
株式会社内			